

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

#15  
2/2/02  
RECEIVED  
JAN 31 2002  
TECH CENTER 1600/2900

In the Patent Application of

BOTTAZZI et al.

Atty. Ref.: 2801-18

Serial No. 09/555,473

Group: 1644

Filed: May 31, 2000

Examiner: Jamroz

For: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING  
THE LONG PENTRAXIN PTX3

\* \* \* \* \*

January 29, 2002

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS**

Sir:

It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

Application No.

Country of Origin

Filed

RM97 A000796

Italy

December 19, 1997

Respectfully submitted,

**NIXON & VANDERHYE P.C.**

By: \_\_\_\_\_

Arthur R. Crawford

Reg. No. 25,327

ARC:lsp  
1100 North Glebe Road, 8th Floor  
Arlington, VA 22201-4714  
Telephone: (703) 816-4000  
Facsimile: (703) 816-4100



# MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



RECEIVED  
C.E. -  
JAN 1 2002  
TECH CENTER 160012900

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. RM97 A 000796

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

R ma, li 18 DIC. 1998

IL REGGENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE  
D.ssa Paola DI CINTIO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A. N.G. SP  
Residenza ROMA codice 0088531004  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome \_\_\_\_\_ cod. fiscale \_\_\_\_\_

denominazione studio di appartenenza \_\_\_\_\_

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.  
via le Shakespeare n. 0047 città ROMA cap 00144 (prov) RM

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) \_\_\_\_\_

gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

" Composizioni farmaceutiche comprendenti pentraxina lunga PTX3 per la  
terapia di patologie di tipo infettivo, infiammatorio o tumorale,  
vettori di espressione comprendenti il cDNA codificante tale  
pentraxina e uso di tali vettori nella terapia genica".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☐

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) BOTTAZZI Barbara 3) MANTOVANI Alberto  
2) INTRONA Martino 4) VECCHI Annunciata

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1) NESSUNA  
2) \_\_\_\_\_

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 19 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
Doc. 2) 0 PROV n. tav. \_\_\_\_\_ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) \_\_\_\_\_  
Doc. 3) 0 RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale \_\_\_\_\_  
Doc. 4) 1 RIS designazione inventore \_\_\_\_\_  
Doc. 5) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano \_\_\_\_\_  
Doc. 6) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione \_\_\_\_\_  
Doc. 7) 0 nominativo completo del richiedente \_\_\_\_\_

3) attestati di versamento, totale lire 365.000. = (trecentosessantacinquemila)

COMPILATO IL 19 12 1997 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) \_\_\_\_\_

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

RM 97 A 000796

ROMA

codice 58

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

Reg. A

L'anno millenovecento

novantasette

il giorno

diciannove

del mese di

dicembre

il (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

Ufficiale Rogante  
Aldo Fassi

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 19/12 1997

NUMERO BREVETTO

RM 97 A 000796

DATA DI RILASCIO

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

Residenza

Viale Shakespeare, 47 - 00144 ROMA

## D. TITOLO

Composizioni farmaceutiche comprendenti pentraxina lunga PTX3 R&R per la terapia di patologie di tipo infettivo, infiammatorio o tumorale, vettori di espressione comprendenti il cDNA codificante tale pentraxina e uso di tali vettori nella terapia genica".

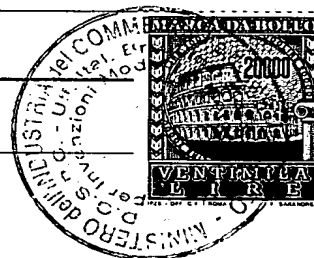
Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

## L. RIASSUNTO

Vengono descritte composizioni farmaceutiche comprendenti una pentraxina lunga PTX3, particolarmente la PTX3 umana, per la terapia di patologie di tipo infettivo, infiammatorio o tumorale; vettori di espressione contenenti il cDNA che codifica tale pentraxina; cellule ospiti ricombinanti transfettate con tali vettori; un metodo per produrre notevoli quantità di PTX3 che prevede la coltura di tali cellule, e l'uso di detti vettori nella terapia genica di tumori.

## M. DISEGNO



La presente invenzione riguarda composizioni farmaceutiche comprendenti pentraxina lunga PTX3 (PTX3) o un suo derivato funzionale. In particolare, l'invenzione riguarda le suddette composizioni per la terapia di patologie di tipo infettivo, infiammatorio  
5 o tumorale.

L'invenzione riguarda inoltre vettori di espressione comprendenti la sequenza completa del cDNA che codifica la PTX3 o un suo derivato funzionale, cellule ospiti ricombinanti transfettate con tali vettori di espressione e un metodo per produrre PTX3 o un suo derivato  
10 funzionale. L'invenzione riguarda infine metodi di terapia genica per il trattamento di tumori, basati sull'uso di detti vettori di espressione.

Fino ad oggi non è stata ancora compresa la funzione biologica della PTX3, una proteina che viene espressa in vari tipi cellulari, particolarmente in fagociti mononucleari e cellule endoteliali, dopo  
15 esposizione alle citochine infiammatorie Interleuchina 1beta (IL-1beta) e Tumor Necrosis Factor alfa (TNF-alfa).

Non è stato altresì descritto fino ad oggi alcun uso terapeutico della PTX3 o di suoi derivati funzionali.

La PTX3 è costituita da due domini strutturali, uno N-terminale non correlato ad alcuna molecola nota, e uno C-terminale simile alle  
20 pentraxine corte quali la proteina C-reattiva (CRP). E' stata riscontrata una elevata somiglianza tra la PTX3 umana (hPTX3) e le PTX3 animali.

Il gene della PTX3 è localizzato nel cromosoma 3 del topo, in una regione analoga alla regione 3q umana (q24-28), in accordo con la  
25 documentata localizzazione della hPTX3 nella regione 3q 25. Inoltre, la

PTX3 di topo (mPTX3) (Introna M., Vidal Alles V., Castellano M., Picardi G., De Gioia L., Bottazzi B., Peri G., Breviario F., Salmona M., De Gregorio L., Dragani T. A., Srinivasan N., Blundell T. L., Hamilton T. A. and Mantovani A.: Cloning of mouse PTX3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood* 87 (1996) 1862-1872) è molto simile alla hPTX3 in base alla organizzazione, localizzazione e sequenza (Breviario F., d'Aniello EM., Golay J., Peri G., Bottazzi B., Bairoch A., Saccone S., Marzella R., Predazzi V., Rocchi M., Della Valle G., Dejana E., Mantovani A., Introna M.: Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. chem.* 267:22190, 1992).

In particolare, il grado di identità fra le sequenze è dell'82% tra il gene umano e quello di topo, e raggiunge il 92% se vengono considerate le sostituzioni conservative.

L'alto grado di somiglianza fra la sequenza della hPTX3 e quella della mPTX3 è un segno dell'alto grado di conservazione della pentraxina durante l'evoluzione (Pepys MB, Baltz ML: Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.* 34:141, 1983).

La CRP è un marker della patologia immunoinfiammatoria e infettiva. Dopo un trauma, una lesione o una infezione di un tessuto, nel soggetto colpito si innesca una serie complessa di reazioni volte a prevenire l'estensione del danno, a distruggere l'organismo infettivo e ad attivare il processo di riparazione per ripristinare le normali funzioni.

Questo processo costituisce la cosiddetta risposta di fase acuta e il marcatore principale attualmente usato per la risposta di fase acuta è costituito dalla CRP. Infatti, nel siero umano normale essa è presente in concentrazioni inferiori a 10 µg/ml, ma può aumentare più di 1000 volte in risposta ad un trauma o ad una infiammazione (Koj A. "Acute phase reactants" in "Structure and function of Plasma Proteins" Allison A., Ed., pp. 73-131, Plenum Press, New York, 1974).

Sono già noti precedenti usi terapeutici della CRP. Ad esempio il brevetto US 4,857,314 del 15.08.1989 descrive l'uso della CRP in associazione con il TNF per il trattamento di tumori.

La domanda di brevetto internazionale PCT/US94/02181 del 24.02.1994 descrive mutanti della CRP utili per la preparazione di kit diagnostici per la determinazione di immunocomplessi nei fluidi biologici e per il trattamento di patologie virali, microbiche, tumorali e per lo shock endotossico.

Anche la domanda di brevetto internazionale PCT/US94/09729 del 26.08.1994 descrive mutanti della CRP utili per la preparazione di kit diagnostici e per il trattamento di patologie virali, microbiche e tumorali.

La capacità di PTX3 di riconoscere e legare in modo specifico ligandi riconosciuti anche dalle pentraxine corte è stata valutata in vitro utilizzando PTX3 ricombinante purificata. Le pentraxine corte come CRP e SAP (componente P serica dell'amiloide) sono caratterizzate dalla capacità di riconoscere e legare in modo calcio-dipendente un ampio spettro di ligandi, tra cui la fosfocolina, la fosfoetanolamina,



molti zuccheri tra cui il meglio caratterizzato è un derivato dell'agarosio ricco in piruvato [metil 4-6-O-(1-carbossietilidene)-beta-D-galattopiranoside] o MO $\beta$ DG, frammenti del complemento e proteine della matrice extracellulare, in particolare fibronectina e collagene di tipo IV. A differenza delle pentraxine corte, PTX3 non è in grado di legare calcio (valutato tramite Inductive Coupled Plasma/Atomic Emission Spectroscopy) nè lega fosfocolina, fosfoetanolamina o MO $\beta$ DG. Inoltre PTX3 non è in grado di legare proteine della matrice extracellulare quali fibronectina e collagene di tipo IV. PTX3 è invece in grado di legare il frammento C1q del complemento riconosciuto anche dalle pentraxine corte ( tabella 1). E' da sottolineare tuttavia che, mentre CRP e SAP devono essere crosslinkate per legare C1q, PTX3 è in grado di riconoscere e legare tale frammento del complemento in forma nativa.

E' stato ora sorprendentemente trovato che la pentraxina lunga PTX3 o i suoi derivati funzionali sono degli agenti terapeutici utili, in particolare per la terapia di patologie di tipo infettivo, infiammatorio o tumorale.

Per "pentraxina lunga PTX3" si intende una qualsiasi pentraxina lunga PTX3, indipendentemente cioè dalla sua origine naturale (umana o animale) oppure sintetica. La pentraxina lunga PTX3 umana (si veda la sequenza 1) risulta preferita.

Un metodo conveniente per produrre notevoli quantità di pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato funzionale consiste nel preparare dei vettori di espressione (ad esempio, plasmidi) comprendenti



la sequenza completa del cDNA che codifica la PTX3 o un suo derivato funzionale e transfettare con questi delle cellule eucariotiche in coltura (ad esempio cellule di Chinese hamster ovary, CHO). Dopo aver clonato le cellule ospiti ricombinanti così transfettate, viene selezionato il clone di cellule in grado di produrre i più elevati livelli di PTX3.

I vettori di espressione precedentemente menzionati comprendenti la sequenza del cDNA che codifica la pentraxina lunga PTX3 vengono inoltre utilizzati, secondo la presente invenzione, in metodi di terapia genica per il trattamento di affezioni tumorali.

Un primo metodo di terapia genica comprende:

- (a) prelevare cellule da un paziente affetto da tumore;
- (b) transfettare tali cellule con un vettore di espressione comprendente la sequenza completa del cDNA che codifica la pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato funzionale; e
- (c) inoculare nel paziente affetto da tumore tali cellule transfettate.

Un secondo metodo di terapia genica per il trattamento di affezioni tumorali comprende:

- (a) preparare un vettore di espressione di origine virale (quale un adenovirus o retrovirus) comprendente la sequenza completa del cDNA che codifica la pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato funzionale; e
- (b) iniettare il vettore di espressione così ottenuto in un paziente affetto da tumore.

Sebbene il meccanismo di azione della PTX3 o dei suoi derivati funzionali non sia stato ancora definitivamente chiarito, la loro attività

antitumorale non è comunque da attribuire ad un effetto citolitico o citostatico diretto sulle cellule tumorali, bensì è da attribuire a meccanismi mediati dall'ospite e legati alla capacità di reclutamento leucocitario, descritta più avanti, esercitata da tali composti.

5 Di seguito vengono descritte le procedure sperimentali e riportati i risultati che dimostrano l'inaspettata attività dei composti secondo l'invenzione.

**Produzione di PTX3 ricombinante:** un frammento contenente la sequenza completa del cDNA di PTX3 umana (SEQUENZA 2) è stato  
10 subclonato nel sito Bam HI del vettore di espressione pSG5 (Fig. 1) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) e transfettato in cellule CHO utilizzando la metodica del Calcio precipitato. Un clone selezionato in G418, in grado di produrre elevati quantitativi di PTX3 venne utilizzato come fonte da cui venne purificata la proteina mediante cromatografia  
15 per scambio ionico e gel filtrazione.

**Legame di PTX3 a C1q:** il legame di PTX3 a C1q è stato valutato in un sistema ELISA. Una piastra a 96 pozzetti venne ricoperta con 250-500 ng di C1q per pozzetto (una notte a 4° C) quindi lavata con PBS con Ca++ e Mg++ contenente 0,05% Tween 20 (PBS). I pozzetti  
20 vennero quindi bloccati con 5% di latte in PBS (2 h a temperatura ambiente) e successivamente incubati con concentrazioni variabili di PTX3 (30 min. a 37 °C). Dopo una nuova serie di lavaggi la piastra venne incubata con un anticorpo monoclonale di ratto contro PTX3 (1 h a temperatura ambiente) e quindi con il secondo anticorpo, un anti IgG  
25 di ratto coniugato alla perossidasi (1 h a temperatura ambiente). Dopo

il lavaggio venne aggiunto il cromogeno e quindi venne letta l'assorbanza a 405 nm utilizzando un lettore di piastre automatico. In alcuni esperimenti i pozzetti sono stati ricoperti con PTX3 e il legame con C1q è stato valutato usando un anticorpo anti C1q.

5 Per determinare l'affinità di legame a C1q venne utilizzata la proteina biotinilata. PTX3 venne biotinilata secondo procedure standard utilizzando una biotina attivata e modificata dall'aggiunta di un "braccio spaziatore" (SPA- Società Prodotti Antibiotici).

10 In Figura 2(A), 2(B) vengono riportati i risultati relativi al legame e alla affinità di legame a C1q. Tali risultati mostrano l'elevata capacità di legame e l'affinità verso C1q da parte di PTX3.

**Reclutamento leucocitario:** il reclutamento leucocitario indotto da PTX3 è stato studiato in vivo nel sistema della tasca sottocutanea. Questa venne indotta nell'animale da esperimento mediante 2 iniezioni sottocutanee sul dorso di 5 mL di aria a tre giorni di distanza l'una dall'altra. Al sesto giorno si procedette alla somministrazione nella tasca di 1 µg della PTX3 in 0,5% di carbossimetilcellulosa. Dopo 4 ore gli animali vennero anestetizzati e la tasca venne lavata con 1 mL di soluzione fisiologica. Il liquido di lavaggio venne recuperato e su di esso vennero effettuate una conta totale e una conta differenziale delle cellule presenti.

25 I risultati ottenuti riportati in figura 3 mostrano l'elevata capacità di reclutamento leucocitario della PTX3 su animali normali, mentre in figura 4 sono riportati i risultati ottenuti in animali geneticamente modificati, privi di C1q, in cui il reclutamento leucocitario è



significativamente inferiore.

**Attività antitumorale:** una linea di mastocitoma murino stata cotransfettata per elettroporazione con il vettore di espressione pSG5 contenente il cDNA di PTX3 umana o il suo antisenso e il vettore pSV2 che conferisce alle cellule transfettate resistenza alla neomicina. Dopo selezione con 0,5 mg/mL di neomicina, le cellule vennero clonate per diluizione limite.

Per valutare la produzione di PTX3,  $2,5 \times 10^5$  cellule vennero coltivate in 200  $\mu$ L di RPMI + 3% FCS per 24 ore e il surnatante venne testato mediante ELISA. I cloni ottenuti produssero livelli di proteina da 1 a 35 ng/mL, mentre i cloni contenenti l'antisenso non produssero livelli misurabili di PTX3. I cloni considerati mostrarono la stessa velocità di crescita in vivo.

Topi DBA/2N CrIBR maschi dell'età di 8-10 settimane vennero iniettati sottocute con  $1 \times 10^5$  cellule di cloni P815 produttori PTX3 o cloni contenenti il gene antisenso. I topi vennero controllati 3 volte alla settimana per la comparsa del tumore e giornalmente per la sopravvivenza.

I risultati ottenuti riportati in tabella 2 mostrano, con questo modello sperimentale di terapia genica, l'efficacia di PTX3 nel determinare la guarigione degli animali e il completo rigetto del tumore dopo attecchimento delle cellule tumorali inoculate.

Tali risultati sono statisticamente significativi con  $p < 0,01$  con test di Fisher, sia rispetto al controllo che al gruppo trattato con l'antisenso.

Alla luce di questi risultati è evidente che l'attività antitumorale sopra riportata è strettamente correlata al reclutamento leucocitario che si verifica nel topo a seguito del riconoscimento del C1q da parte della PTX3. In topi modificati geneticamente tale reclutamento leucocitario non si verifica. La capacità di reclutamento leucocitario, alla base dell'attività antitumorale dei composti secondo l'invenzione, indica che tali composti possono anche trovare una utile applicazione nel trattamento di patologie causate da agenti patogeni quali batteri, funghi, protozoi o virus.

**TABELLA 1** CAPACITA' DI LEGAME A DIVERSI LIGANDI DA PARTE DELLE PENTRAXINE

	CRP	SAP	PTX3
- Ca <sup>2+</sup>	+	+	-
- Fosfocolina	+	-	-
- Fosfoetanolamina	+	+	-
- MO $\beta$ DG	-	+	-
- C1q	+	+	+
- Collagene Tipo IV	ND	+	-
- Fibronectina	ND	+	-

ND: Test non eseguito

Tabella 2

ATTIVITA' ANTITUMORALE IN VIVO DI PTX3

Clone <sup>1</sup>	Rigetto <sup>2</sup>
P815 parentale (Controllo)	4/25
P815-AS1 (antisenso)	3/8
P815-PTX3-1 (senso)	14/14*

1: 10<sup>5</sup> cellule del clone indicato sono state iniettate sottocute.

2: Numero di animali che rigettano definitivamente il tumore sul totale di animali in cui è attecchito.

\*  $p < 0.01$  sia rispetto ai topi trattati con le cellule parentali che ai topi trattati con le cellule dei cloni antisenso (test di Fisher)

## Sequenza 1

<u>HLLAILFCAL</u>	<u>WSAVLA</u> ENSD	DYDLMYVNLD	NEIDNGLHPT	<sup>M</sup>	1
EDPTPCDCGQ	EHSEWDKLF	I MLENSQMRER	MLLQATDDVL		41
RGELQRLREE	LGRLAESLAR	PCAPGAPAEA	RLTSALDELL		81
QATRDAGRRL	ARMEGAEAAQR	PEEAGRALAA	VLEELRQTRA		121
DLHAVQGWAA	RSWLPAGCET	AILFPMRSKK	IFGSVHPVRP		161
MRLESFSACI	WVKATDVLNK	TILESYGTRK	NPYEIQLYLS		201
YQSIVFVVG	EEENKLVAEAM	VSLGRWTHLC	GTWNSEEGLT		241
SLWVNGELAA	TTVEMATGHI	VPEGGILOIG	QEKNGCCVGG		281
GFDETLAFSG	RLTGFNWDS	VLSNEEIRET	GGAESCHIRG		321
NIVGWGVTEI	QPHGGAQYVS				361
					381

Sequenza amincacidica di PTX3 umana. Gli aminoacidi sottolineati costituiscono il peptide segnale. hPTX3 matura è costituita da 364 aa.



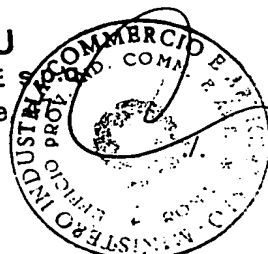
## Sequenza 2

ctca aactcagetc acctgagagt ctctctccgc cagctgtgga aagaactttg	54
cgtctctccca gcaATGCATC TCCTTSCGAT TCTCTTTTGT CCTCTCTCGT CTGCAGTGT	114
GGCCGAGAAC TCGGATGATT ATGATCTCAT GTATGTGAAT TTGGACAACC AAATACACAA	174
TGGACTCCAT CCCACTCAGG ACCCCACGCC GTGCGACTGC GGTCCAGAGC ACTCGGAATC	234
GGACAAGCTC TTCATCATGC TCGAGAACTC GCAGATGAGA GAGCGCATGC TGCTGCAAGC	294
CACGGACGAC GTCTCTCCGG GCGAGCTGCA GAGGCTCCGG GAGGAGCTGG GCGGGCTCGC	354
GGAAAGCCTG CCGAGGCGCT GCGCGCCCGG GCTTCCCGCA GAGGCCAGGC TGACCAGTGC	414
TCTGGACGAG CTGCTCCAGG CGACCCCGCA CCGGGCCCGC AGGCTGGCGC GTATGGAGGG	474
CGCGGAGCGG CAGCCCGCAG AGGAGGCGCG GCGCGCCCTG GCGCGGCTGC TAGAGCAGCT	534
GCGGGCAGAG CGAGCCGACC TGCACGCGGT GCAGGGCTGG GCTGCCCGCA GCTGGCTGCC	594
GCCAGGTTGT GAAACAGCTA TTTTATTCCC AATGCGTTCC AAGAAGATTT TTGGAAGCGT	654
GCATCCAGTG AGACCAATGA GGCTTGAGTC TTTTAGTGCC TGCATTGGG TCAAAGCCAC	714
AGATGTATTA AACAAAACCA TCCTGTTTTT CTATGGCACA AAGAGGAATC CATATGAAAT	774
CCAGCTGTAT CTCAGCTACC AATCCATAGT GTTGTGGTG GCTGGAGAGG AGAACAACT	834
GTTTCTCAA GCCATGTTTT CCTTGGCAG GTGACCCAC CTGTCCCGCA CTTGGAATTC	894
AGAGGAAGGC CTCACATCCT TGTGGGTAAA TGCTGAAGTC GCGGCTACCA CTGTTGAGAT	954
GCCACAGGT CACATTCTTC CTGAGCGAGG AATCTTCCAG ATTGGCCAG AAAAGAATGG	1014
CTGCTGTGTG GCTGGTGGCT TTGATGAAC ATTAGCCTTC TCTGGGAGAC TCACAGGCTT	1074
CAATATCTGC GATAGCTTTC TTAGCAATGA AGAGATAAGA GAGACCGGAG GAGCAGAGTC	1134
TGTCAATC CCGGGGAATA TTCTTGGGTG GCGAGTCACA GAGATCCAGC CACATGGAGG	1194
AGCTCACTAT GTTTCTAAA tgttstgaaa ctccacttga agccaaagaaa gaaactcac	1254
acttaaaaca catgccagtt ggaaggtct gaaaactcag tgcataatag gaacacttga	1314
gactaatgaa agagagagtt gagaccaatc tttatttgta ctggccaaat actgaataaa	1374
cagttgaagg aaagacattg gaaaaagctt	1404

sequenza nucleotidica del frammento di cDNA di PTX3 umana. In lettere maiuscole sono indicati i nucleotidi codificanti per la proteina, mentre in lettere minuscole sono indicate le regioni al 3' e al 5' non tradotte ma presenti nel costrutto.

19 DIC. 1997

SIGMA TAU  
IND. FARM. RIUNITE  
Viale Shakespeare  
00144 ROMA





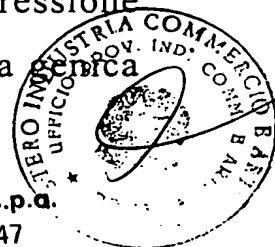
### RIVENDICAZIONI

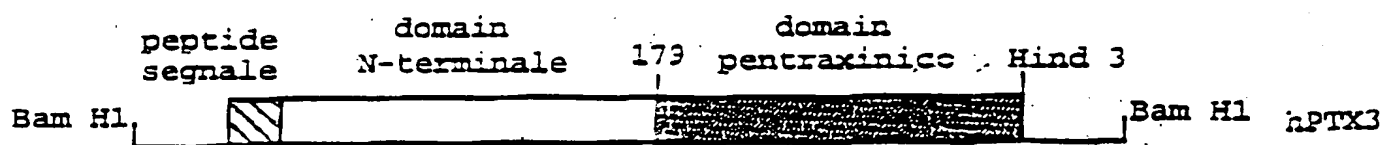
1. Composizione farmaceutica somministrabile per via orale, parenterale, transdermica o sottocutanea comprendente come principio attivo la sequenza amminoacidica della pentraxina lunga PTX3, e un eccipiente farmacologicamente accettabile.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1 in cui la sequenza della pentraxina lunga PTX3 è la sequenza della PTX3 presente in natura.
3. Composizione secondo la rivendicazione 2 in cui la sequenza della pentraxina lunga PTX3 è la sequenza della PTX3 umana.
4. Composizione secondo le rivendicazioni 1-3, per il trattamento di patologie di tipo infettivo, infiammatorio o tumorale.
5. Composizione secondo la rivendicazione 4, per il trattamento di malattie causate da batteri, funghi, protozoi o virus.
6. Vettore di espressione comprendente la sequenza completa del cDNA che codifica la pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato funzionale.
7. Vettore secondo la rivendicazione 6 che è un plasmide.
8. Vettore secondo la rivendicazione 7 che è il plasmide pSG5.
9. Cellule ospiti ricombinanti transfettate con il vettore di espressione delle rivendicazioni 6-8.
10. Cellule ospiti secondo la rivendicazione 9 che sono cellule CHO.
11. Metodo per produrre pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato funzionale che comprende il sottoporre a coltura le cellule delle rivendicazioni 9-10.
12. Metodo di terapia genica per il trattamento di affezioni tumorali comprendente:
  - (a) prelevare cellule da un paziente affetto da tumore;

- (b) transfettare tali cellule con un vettore di espressione comprendente la sequenza completa del cDNA che codifica la pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato funzionale; e
  - (c) inoculare nel paziente affetto da tumore tali cellule transfettate.
13. Metodo di terapia genica per il trattamento di affezioni tumorali comprendente:
- (a) preparare un vettore di espressione di origine virale comprendente la sequenza completa del cDNA che codifica la pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato funzionale; e
  - (b) iniettare il vettore di espressione così ottenuto in un paziente affetto da tumore.
14. Metodo secondo la rivendicazione 13, in cui il vettore di espressione di origine virale è un adenovirus o un retrovirus.
15. Uso della pentraxina lunga PTX3 per la preparazione di un medicamento per il trattamento di patologie di tipo infettivo, infiammatorio o tumorale.
16. Uso secondo la rivendicazione 15 in cui la pentraxina lunga PTX3 è la pentraxina umana di sequenza 1.
17. Uso secondo la rivendicazione 16 per la preparazione di un medicamento per il trattamento di malattie causate da batteri, funghi, protozoi o virus.
18. Uso del cDNA che codifica la pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato funzionale per preparare dei vettori di espressione comprendenti tale cDNA da utilizzare in metodi di terapia genica per il trattamento di affezioni tumorali.

19 DIC. 1997

**SIGMA TAU**  
IND. FARM. RIUNITE s.p.a.  
Viale Shakespeare, 47  
00144 ROMA



**FIGURA 1**

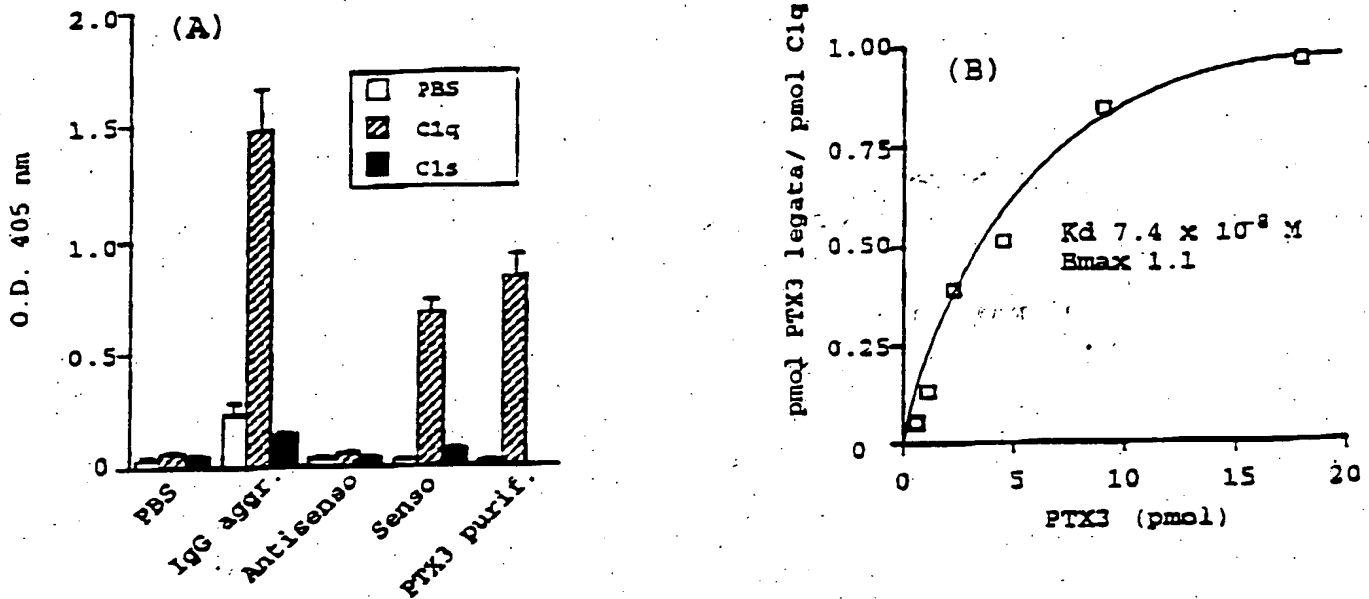
**FIGURA 2**

Figura 2: legame di PTX3 a Clq. Il pannello A mostra il legame del supernatante di cultura contenente PTX3 (senso) e della proteina purificata a Clq e Cl3 immobilizzati su plastica. Il binding è valutato come Densità Ottica (O.D.) a 405 nm. Il pannello B mostra la curva di saturazione, ottenuta con la proteina biotinilata. I parametri cinetici sono stati calcolati con il metodo statistico del fitting non lineare



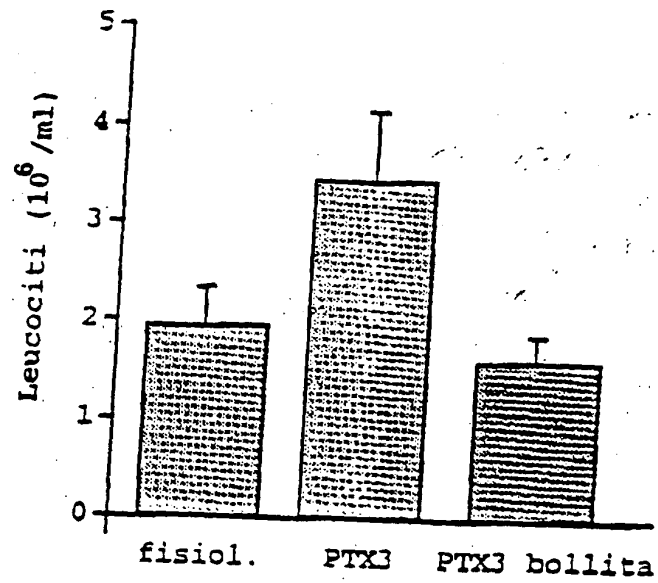
**FIGURA 3**

Figura 3: reclutamento leucocitario indotto da PTX3: 1  $\mu\text{g}$  di PTX3 viene iniettato in una tasca sottocutanea indotta sul dorso di topi CD1 mediante inoculo di 5 ml di aria.

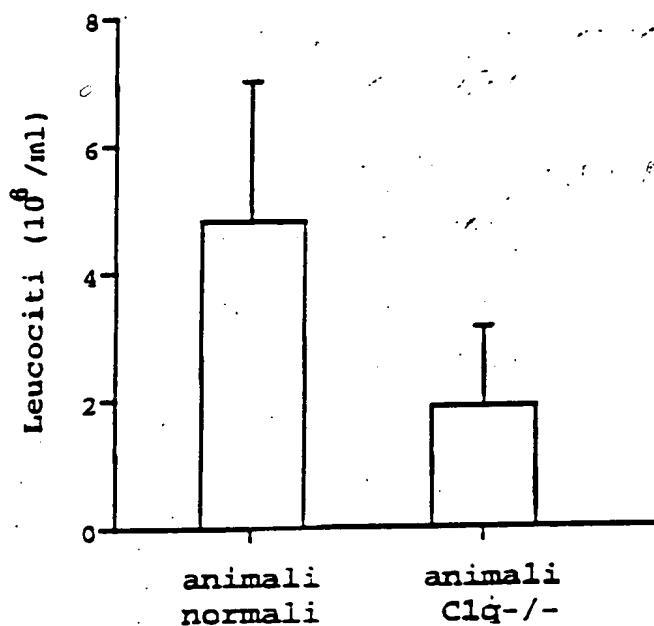
**FIGURA 4**

Figura 4: Reclutamento leucocitario indotto da PTX3 in animali normali e in animali geneticamente modificati privi di Clq. PTX3 viene iniettata in una tasca sottocutanea indotta sul dorso degli animali.

